AQUEOUS AEROSOL PREPARATIONS CONTAINING BIOLOGICALLY ACTIVE MACROMOLECULES AND METHOD FOR PRODUCING THE CORRESPONDING AEROSOLS

Patent number: WO9907340 (A1)

Publication date: 1999-02-18

Inventor(s): LAMCHE HERBERT [AT]; MEADE CHRISTOPHER JOHN MONTAGU [DE]; ZIERENBERG BERND [DE] +

Applicant(s): BOEHRINGER INGELHEIM PHARMA [DE]; LAMCHE HERBERT [AT]; MEADE CHRISTOPHER JOHN MONTAGU [DE]; ZIERENBERG BERND [DE] +

Classification:

- international: ***A61K31/7088; A61K38/04; A61K38/17; A61K38/20; A61K38/21; A61K38/22; A61K38/23; A61K38/28; A61K38/29; A61K38/44; A61K38/45; A61K38/46; A61K39/00; A61K9/00; A61K9/06; A61K9/12; A61L9/12; A61M15/00;*** **A61K31/7088; A61K38/04; A61K38/17; A61K38/20; A61K38/21; A61K38/22; A61K38/23; A61K38/28; A61K38/29; A61K38/43; A61K39/00; A61K9/00; A61K9/06; A61K9/12; A61L9/12; A61M15/00;** (IPC1-7): A61K38/28; A61K9/00

- european: A61K38/17; A61K38/21; A61K38/44B; A61K9/00M20B; A61K9/00M20B5

Application number: WO1998EP04803 19980731

Priority number(s): DE19971033651 19970804

Also published as:

DE19733651 (A1)
ZA9806931 (A)
UY25122 (A1)
UA73076 (C2)
TW222887 (B)

more >>

Cited documents:

WO9503034 (A1)
WO9417822 (A1)
DE4117078 (A1)
WO9206704 (A1)
WO9009781 (A1)

Abstract of **WO 9907340 (A1)**

The invention relates to aqueous aerosol preparations containing biologically active macromolecules for producing inhalable aerosols without propellant gases.

Data supplied from the ***espacenet*** database — Worldwide

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :
A61K 9/00, 38/28

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 99/07340**

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. Februar 1999 (18.02.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/04803

(22) Internationales Anmeldedatum: 31. Juli 1998 (31.07.98)

(30) Prioritätsdaten:
197 33 651.5 4. August 1997 (04.08.97) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: BOEHRINGER INGELHEIM PHARMA KG [DE/DE]; D–55216 Ingelheim am Rhein (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: LAMCHE, Herbert [AT/AT]; Friedhofsgasse 453, A–2534 Alland (AT). MEADE, Christopher, John, Montague [GB/DE]; Burgstrasse 104, D–55411 Bingen am Rhein (DE). ZIERENBERG, Bernd [DE/DE]; Goethestrasse 1, D–55411 Bingen am Rhein (DE).

(74) Anwalt: LAUDIEN, Dieter; Boehringer Ingelheim GmbH, A Patente, D–55216 Ingelheim am Rhein (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, HU, ID, IL, JP, KR, KZ, LT, LV, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, UA, US, UZ, VN, YU, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: AQUEOUS AEROSOL PREPARATIONS CONTAINING BIOLOGICALLY ACTIVE MACROMOLECULES AND METHOD FOR PRODUCING THE CORRESPONDING AEROSOLS

(54) Bezeichnung: WÄSSRIGE AEROSOLZUBEREITUNGEN ENTHALTEND BIOLOGISCH AKTIVE MAKROMOLEKÜLE UND VERFAHREN ZUR ERZEUGUNG ENTSPRECHENDER AEROSOLE

(57) Abstract

The invention relates to aqueous aerosol preparations containing biologically active macromolecules for producing inhalable aerosols without propellant gases.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft wäßrige Aerosolzubereitungen enthaltend biologisch aktive Makromoleküle für die treibgasfreie Erzeugung von inhalierbaren Aerosolen.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	**ES**	Spanien	**LS**	Lesotho	**SI**	Slowenien
AM	Armenien	**FI**	Finnland	**LT**	Litauen	**SK**	Slowakei
AT	Österreich	**FR**	Frankreich	**LU**	Luxemburg	**SN**	Senegal
AU	Australien	**GA**	Gabun	**LV**	Lettland	**SZ**	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	**GB**	Vereinigtes Königreich	**MC**	Monaco	**TD**	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	**GE**	Georgien	**MD**	Republik Moldau	**TG**	Togo
BB	Barbados	**GH**	Ghana	**MG**	Madagaskar	**TJ**	Tadschikistan
BE	Belgien	**GN**	Guinea	**MK**	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	**TM**	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	**GR**	Griechenland			**TR**	Türkei
BG	Bulgarien	**HU**	Ungarn	**ML**	Mali	**TT**	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	**IE**	Irland	**MN**	Mongolei	**UA**	Ukraine
BR	Brasilien	**IL**	Israel	**MR**	Mauretanien	**UG**	Uganda
BY	Belarus	**IS**	Island	**MW**	Malawi	**US**	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	**IT**	Italien	**MX**	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	**JP**	Japan	**NE**	Niger	**UZ**	Usbekistan
CG	Kongo	**KE**	Kenia	**NL**	Niederlande	**VN**	Vietnam
CH	Schweiz	**KG**	Kirgisistan	**NO**	Norwegen	**YU**	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	**KP**	Demokratische Volksrepublik Korea	**NZ**	Neuseeland	**ZW**	Zimbabwe
CM	Kamerun			**PL**	Polen		
CN	China	**KR**	Republik Korea	**PT**	Portugal		
CU	Kuba	**KZ**	Kasachstan	**RO**	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	**LC**	St. Lucia	**RU**	Russische Föderation		
DE	Deutschland	**LI**	Liechtenstein	**SD**	Sudan		
DK	Dänemark	**LK**	Sri Lanka	**SE**	Schweden		
EE	Estland	**LR**	Liberia	**SG**	Singapur		

Wäßrige Aerosolzubereitungen enthaltend biologisch aktive Makromoleküle und Verfahren zur Erzeugung entsprechender Aerosole

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erzeugung von Aerosolen für die inhalative Applikation von Proteinen und anderen biologisch aktiven Makromolekülen sowie wäßrige Zubereitungen zur Erzeugung solcher Aerosole, insbesondere betrifft die Erfindung wäßrige Zubereitungen hochkonzentrierter Lösungen von Insulin für die inhalative Applikation zur Behandlung von Diabetes.

Die Anwendung von Arzneistoffen in Form inhalierfähiger Aerosole ist seit langem bekannt. Solche Aerosole dienen nicht nur zur Behandlung von Atemwegserkrankungen wie Asthma; sie werden auch verwendet, wenn die Lunge oder die Nasenschleimhäute als Resorptionsorgan dienen sollen. Häufig können so hohe Blutspiegel des Wirkstoffes erzeugt werden , um auch Krankheiten in anderen Körperregionen zu behandeln. Inhalierbare Aerosole können auch als Impfstoffe dienen.

Zur Herstellung von Aerosolen werden in der Praxis mehrere Verfahren angewendet. Entweder werden Suspensionen oder Lösungen von Wirkstoffen mit Hilfe von Treibgasen versprüht oder Wirkstoffe in Form mikronisierter Pulver in der Atemluft verwirbelt oder schließlich wäßrige Lösungen mit Hilfe von Verneblern zerstäubt.

Doch bei komplizierter gebauten Molekülen, wie z.B. Interferonen, kann die Verneblung wäßriger Lösungen leicht zu einer störenden Verminderung der Wirkstoffaktivität führen, vermutlich durch Scherkräfte und Erwärmung. Es wird vermutet, daß in diesem Prozeß z.B. die Bildung minderaktiver Proteinaggregate eine Rolle spielt. A.Y. Ip und Kollegen haben, in Ihrem Artikel 'Stability of recombinant consensus interferon to air-jet and ultrasonic

nebulisation' J. Pharm. Sci. 84:1210-1214 [1995], Beispiele für die Entstehung von Interferonaggregaten nach Ultraschall oder Düsen-Verneblung, mit damit einhergehendem Verlust der biologischen Aktivität des Interferones beschrieben. Auch wenn die Zerstörung des Biomoleküls (biologisch aktive Makromoleküle) nicht vollständig ist, ist die hier beschriebene Aktivitätsverminderung wichtig, weil sie einen größeren Verbrauch des möglicherweise teuren Biomoleküles verursacht und die Dosierung an aktivem Arzneimittel pro Hub ungenau werden läßt. Diese Abnahme der Aktivität von kompliziert gebauten Molekülen während der Aerosolerzeugung ist nicht nur auf Interferone begrenzt, sie kommt in kleinerem oder größerem Maß auch während der Aerosolisierung anderer Proteine (siehe z.B. Niven et al, Pharm Res. 12: 53-59 [1995]) und Biomoleküle vor.

Neben der technischen Herstellung des das Biomolekül enthaltenden Aerosols ist ein zweiter Schritt notwendig, damit die Biomoleküle in der Lunge absorbiert werden. Die Lunge des erwachsenen Menschen bietet eine große Absorptionsfläche, aber sie weist auch mehrere Hindernisse für die pulmonäre Absorption von Biomolekülen auf. Nach Inspiration durch die Nase oder den Mund geht Luft mit dem von ihr getragenen Aerosol in die Trachea und dann über immer kleinere Bronchien und Bronchiolen in die Alveoli. Die Alveoli haben eine viel größere Fläche als Trachea, Bronchi und Bronchiolen zusammen. Sie sind die Hauptabsorptionszone, nicht nur für Sauerstoff, sondern auch für biologisch aktive Makromoleküle. Um aus der Luft in die Blutbahn zu gelangen, müssen Moleküle das alveoläre Epithel, das kapilläre Endothel und den lymphe-enthaltenden interstitiellen Raum zwischen diesen zwei Zell-Schichten durchqueren. Dies kann über aktive oder passive Transportprozesse stattfinden. Die Zellen in diesen zwei Zell-Schichten liegen dicht beieinander, so daß die meisten großen biologischen Makromoleküle (wie z.B. Proteine) diese Sperre viel langsamer durchqueren als kleinere Moleküle. Der Prozeß der Durchquerung des alveolären Epithels

und des kapillären Endothels läuft in Konkurrenz mit anderen biologischen Prozessen die zur Zerstörung des Biomoleküls führen. Die bronchoalveoläre Flüssigkeit enthält Exoproteasen [siehe z.B. Wall D.A. und Lanutti, A.T. 'High levels of exopeptidase activity are present in rat and canine bronchoalveolar lavage fluid'. Int.J.Pharm. 97:171-181 (1993)]. Sie enthält auch Macrophagen, welche inhalierte Protein-Teilchen mittels Phagozytose eliminieren. Diese Macrophagen migrieren zur Basis des bronchialen Baumes, von wo aus sie mittels des mucoziliaren Clearance Mechanismus aus der Lunge geraten. Sie können dann in die Lymphbahn migrieren. Weiter können die Macrophagen vom aerosolisierten Protein in ihrer Physiologie beeinflußt werden, z.B. können Interferone alveolare Macrophagen aktivieren. Die Migration von aktivierten Macrophagen stellt einen weiteren Mechanismus für die Verbreitung der systemischen Wirkung eines inhalierten Proteins dar. Die Komplexität dieses Prozesses bedeutet, daß Ergebnisse von Aerosol-Versuchen mit einem Protein Typ auf einen anderen Protein Typ nur begrenzt übertragbar sind. Kleine Unterschiede zwischen Interferonen können zum Beispiel einen deutlichen Einfluß auf Ihre Susceptibilität gegenüber den Degradationsmechanismen in der Lunge haben [siehe Bocci et al 'Pulmonary catabolism of interferons: alveolar absorption of ^{125}I labelled human interferon alpha is accompanied by partial loss of biological activity' Antiviral Research 4:211-220 (1984)].

Proteine und andere biologische Makromoleküle können zwar prinzipiell vernebelt werden, aber diese Verneblung findet in der Regel mit einem Aktivitätsverlust statt. Es ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ein Verfahren für die Herstellung von inhalierbaren Aerosolen zur Verfügung zu stellen, mit dem biologisch aktive Makromoleküle, insbesondere Proteine, ohne wesentliche Aktivitätsverluste vernebelt werden können.

Eine neue Generation von treibgasfreien Verneblern ist in dem US-Patent 5,497,944 beschrieben, auf das hiermit inhaltlich Bezug genommen wird. Der

besondere Vorteil der dort beschriebenen Vernebler ist, daß auf die Verwendung von Treibgasen, insbesondere von Fluorochlorkohlenwasserstoffen, verzichtet wird.

Eine weiterentwickelte Ausführungsform der dort beschriebenen Vernebler ist in der PCT/EP96/04351 = WO 97/12687 offenbart. In Bezug auf die vorliegende Erfindung wird ausdrücklich auf die dort beschriebene Figur 6 (Respimat®) sowie auf die dazugehörigen Beschreibungsteile der Anmeldung verwiesen. Der dort beschriebene Vernebler kann vorteilhaft zur Erzeugung der erfindungsgemäßen inhalierbaren Aerosole biologisch aktiver Makromoleküle eingesetzt werden. Insbesondere kann der beschriebene Vernebler zur inhalativen Applikation von Insulin eingesetzt werden. Aufgrund seiner handlichen Größe kann dieses Device jederzeit vom Patienten mitgeführt werden. Bei dem dort beschriebenen Vernebler werden wirkstoffhaltige Lösungen definierter Volumina (bevorzugt ca. 15 Mikroliter) unter Anwendung hoher Drucke durch kleine Düsen versprüht, so daß inhalierbare Aerosole mit einer mittleren Teilchengröße zwischen 3 und 10 Mikrometer entstehen. Für die Inhalative Applikation von Insulin sind Vernebler geeignet, die zwischen 10 und 50 Mikroliter Aerosolzubereitung pro Anwendung zu inhalierbaren Tröpfchen vernebeln können.

Von besonderer Bedeutung zur Herstellung der erfindungsgemäßen Aerosole ist die Verwendung des in dem oben beschriebenen Patent bzw. Patentanmeldung beschriebenen Verneblers zum treibgasfreien Zerstäuben von wirkstoffhaltigen Lösungen, die Proteine oder andere biologisch aktive Makromoleküle enthalten.

Im wesentlichen besteht der dort offenbarte handhabbare Zerstäuber (Vernebler, Größe ca. 10 cm) aus einem Gehäuseoberteil, einem Pumpengehäuse, einer Düse, einem Sperrspannwerk, einem Federgehäuse, einer Feder und einem Vorratsbehälter, gekennzeichnet durch

- ein Pumpengehäuse, das im Gehäuseoberteil befestigt ist, und das an seinem einen Ende einen Düsenkörper mit der Düse bzw. Düsenanordnung trägt,
- einen Hohlkolben mit Ventilkörper,
- einen Abtriebsflansch, in dem der Hohlkolben befestigt ist, und der sich im Gehäuseoberteil befindet,
- ein Sperrspannwerk, das sich im Gehäuseoberteil befindet,
- ein Federgehäuse mit der darin befindlichen Feder, das am Gehäuseoberteil mittels eines Drehlagers drehbar gelagert ist,
- ein Gehäuseunterteil, das auf das Federgehäuse in axialer Richtung aufgesteckt ist.

Der Hohlkolben mit Ventilkörper WO 97/12687 entspricht einer in der offenbarten Vorrichtungen. Er ragt teilweise in den Zylinder des Pumpengehäuses hinein und ist im Zylinder axial verschiebbar angeordnet. Insbesondere wird auf die Figuren 1-4 - insbesondere Figur 3 - und die dazugehörigen Beschreibungsteile Bezug genommen. Der Hohlkolben mit Ventilkörper übt auf seiner Hochdruckseite zum Zeitpunkt des Auslösens der Feder einen Druck von 5 bis 60 Mpa (etwa 50 bis 600 bar), bevorzugt 10 bis 60 Mpa (etwa 100 bis 600 bar) auf das Fluid, die abgemessene Wirkstofflösung aus.

Der Ventilkörper ist bevorzugt an dem Ende des Hohlkolbens angebracht, das dem Düsenkörper zugewandt ist.

Die Düse im Düsenkörper ist bevorzugt mikrostrukturiert, d.h. durch Mikrotechnik hergestellt. Mikrostrukturierte Düsenkörper sind beispielsweise in WO-94/07607 offenbart; auf diese Schrift wird hiermit inhaltlich Bezug genommen.

Der Düsenkörper besteht z.B. aus zwei fest miteinander verbundenen Platten aus Glas und/oder Silizium, von denen wenigstens eine Platte einen oder mehrere mikrostrukturierte Kanäle aufweist, die die Düseneinlaßseite mit der Düsenauslaßseite verbinden. Auf der Düsenauslaßseite ist mindestens eine runde oder nicht-runde Öffnung von kleiner oder gleich 10 µm angebracht.

Die Strahlrichtungen der Düsen im Düsenkörper können parallel zueinander verlaufen oder gegeneinander geneigt sein. Bei einem Düsenkörper mit mindestens zwei Düsenöffnungen auf der Auslaßseite können die Strahlrichtungen wird ein Winkel von 20 Grad bis 160 Grad gegeneinander geneigt sein, bevorzugt wird ein Winkel von 60 bis 150 Grad. Die Strahlrichtungen treffen sich in der Umgebung der Düsenöffnungen.

Das Sperrspannwerk enthält eine Feder, bevorzugt eine zylindrische schraubenförmige Druckfeder, als Speicher für die mechanische Energie. Die Feder wirkt auf den Abriebsflansch als Sprungstück, dessen Bewegung durch die Position eines Sperrglieds bestimmt wird. Der Weg des Abriebsflansches wird durch einen oberen und einen unteren Anschlag präzise begrenzt. Die Feder wird bevorzugt über ein kraftübersetzendes Getriebe, z.B. ein Schraubschubgetriebe, durch ein äußeres Drehmoment gespannt, das beim Drehen des Gehäuseoberteils gegen das Federgehäuse im Gehäuseunterteil erzeugt wird. In diesem Fall enthalten das Gehäuseoberteil und der Abtriebsflansch ein ein- oder mehrgängiges Keilgetriebe.

Das Sperrglied mit einrückenden Sperrflächen ist ringförmig um den Abtriebsflansch angeordnet. Es besteht z.B. aus einem in sich radial elastisch verformbaren Ring aus Kunststoff oder aus Metall. Der Ring ist in einer Ebene senkrecht zur Zerstäuberachse angeordnet. Nach dem Spannen der Feder schieben sich die Sperrflächen des Sperrgliedes in den Weg des Abtriebsflansches und verhindern das Entspannen der Feder. Das Sprerrglied wird mittels einer Taste ausgelöst. Die Auslösetaste ist mit dem

Sperrglied verbunden oder gekoppelt. Zum Auslösen des Sperrspannwerkes wird die Auslösetaste parallel zur Ringebene, und zwar bevorzugt in den Zerstäuber hinein, verschoben; dabei wird der verformbare Ring in der Ringebene verformt. Konstruktive Details des Sperrspannwertes sind in der WO 97/20590 beschrieben.

Das Gehäuseunterteil wird in axialer Richtung über das Federgehäuse geschoben und verdeckt die Lagerung, den Antrieb der Spindel und den Vorratsbehälter für das Fluid.

Beim Betätigen des Zerstäubers wird das Gehäuseobereil gegen das Gehäuseunterteil gedreht, wobei das Gehäuseunterteil das Federgehäuse mitnimmt. Dabei wird die Feder über das Schraubschubgetriebe zusammengedrückt und gespannt, und das Sperrwerk rastet selbsttätig ein. Der Drehwinkel ist bevorzugt ein ganzzahliger Bruchteil von 360 Grad, z.B. 180 Grad. Gleichzeitig mit dem Spannen der Feder wird das Abtriebsteil im Gehäuseoberteil um einen vorgegebenen Weg verschoben, der Hohlkolben wird innerhalb des Zylinders im Pumpengehäuse zurückgezogen, wodurch eine Teilmenge des Fluids aus dem Vorratsbehälter in den Hochdruckraum vor der Düse eingesaugt wird.

In den Zerstäuber können gegebenenfalls nacheinander mehrere das zu zerstäubende Fluid enthaltende austauschbare Vorratsbehälter eingeschoben und benutzt werden. Der Vorratsbehälter enthält die erfindungsgemäße wässerige Aerosolzubereitung.

Der Zerstäubungsvorgang wird durch leichtes Eindrücken der Auslösetaste eingeleitet. Dabei gibt das Sperrwerk den Weg für das Abtriebsteil frei. Die gespannte Feder schiebt den Kolben in den Zylinder des Pumpengehäuses hinein. Das Fluid tritt aus der Düse des Zerstäubers in zerstäubter Form aus.

Weitere konstruktive Details sind in den PCT-Anmeldungen WO 97/12683 und WO 97/20590 offenbart, auf die hiermit inhaltlich Bezug genommen wird.

Die Bauteile des Zerstäubers (Verneblers) sind aus einem der Funktion entsprechend geeignetem Material. Das Gehäuse des Zerstäubers und – so weit es die Funktion erlaubt – auch andere Teile sind bevorzugt aus Kunststoff, z.B. im Spritzgießverfahren, hergestellt. Für medizinische Zwecke werden physiologisch unbedenkliche Materialien verwendet.

Der in der WO 97/12687 beschriebene Zerstäuber wird z.B. zum treibgasfreien Erzeugen medizinischer Aerosole benutzt. Damit läßt sich ein inhalierbares Aerosol mit einer mittleren Tröpfchengröße von etwa 5 µm erzeugen.

In den Figuren 4 a/b die identisch mit den Figuren 6 a/b der WO 97/12687 sind, ist der Vernebler (Respimat®) beschrieben, mit dem die erfindungsgemäßen wäßrigen Aerosolzubereitungen vorteilhaft inhaliert werden können.

Figur 4 a zeigt einen Längsschnitt durch den Zerstäuber bei gespannter Feder, Figur 4 b zeigt einen Längsschnitt durch den Zerstäuber bei entspannter Feder.

Das Gehäuseoberteil (51) enthält das Pumpengehäuse (52), an dessen Ende der Halter (53) für die Zerstäuberdüse angebracht ist. In dem Halter befindet sich der Düsenkörper (54) und ein Filter (55). Der im Abtriebsflansch (56) des Sperrspannwerkes befestigte Hohlkolben (57) ragt teilweise in den Zylinder des Pumpengehäuses hinein. An seinem Ende trägt der Hohlkolben den Ventilkörper (58). Der Hohlkolben ist mittels der Dichtung (59) abgedichtet. Innerhalb des Gehäuseoberteils befindet sich der Anschlag (60), an dem der Abtriebsflansch bei entspannter Feder anliegt. Am Abtriebsflansch befindet

sich der Anschlag (61), an dem der Abtriebsflansch bei gespanner Feder anliegt. Nach dem Spannen der Feder schiebt sich das Sperrglied (62) zwischen den Anschlag (61) und eine Abstützung (63) im Gehäuseoberteil. Die Auslösetaste (64) steht mit dem Sperrglied in Verbindung. Das Gehäuseobereil endet im Mundstück (65) und ist mit der aufsteckbaren Schutzkappe (66) verschlossen.

Das Federgehäuse (67) mit Druckfeder (68) ist mittels der Schnappnasen (69) und Drehlager am Gehäuseoberteil drehbar gelagert. Über das Federgehäuse ist das Gehäueunterteil (70) geschoben. Innerhalb des Federgehäuses befindet sich der austauschbare Vorratsbehälter (71) für das zu zerstäubende Fluid (72). Der Vorratsbehälter ist mit dem Stopfen (73) verschlossen, durch den der Hohlkolben in den Vorratsbehälter hineinragt und mit seinem Ende in das Fluid (Vorrat an Wirkstofflösung) eintaucht.

In der Mantelfläche des Federgehäuses ist die Spindel (74) für das mechanische Zählwerk angebracht. An dem Ende der Spindel, das dem Gehäuseoberteil zugewandt ist, befindet das Antriebsritzel (75). Auf der Spindel sitzt der Reiter (76).

Der oben beschriebene Vernebler ist geeignet, die erfindungsgemäßen Aerosolzubereitungen zu einem für die Inhalation geeignetem Aerosol zu vernebeln.

Die Effektivität eines Verneblungsgerätes kann in einem *in vitro* System getestet werden, in dem eine Proteinlösung vernebelt wird und der Nebel in einer sogenannten 'Falle' (siehe Fig. 1) abgefangen wird. Die Aktivität des Proteins im Aerosolreservoir (a) wird mit der Aktivität in der aufgefangenen Flüssigkeit (b) verglichen, z.B: mit Hilfe eines Immunoassays oder mit Hilfe eines Assays für die biologische Wirksamkeit des Proteins. Dieser Versuch erlaubt eine Beurteilung des Grades der Zerstörung des Proteins durch

Verneblung. Ein zweiter Parameter der Aerosolqualität ist der sogenannte inhalierbare Anteil, der hier als Anteil der Nebeltröpfchen mit einem Maß-medianen aerodynamischen Durchmesser (MMAD) von weniger als 5.8 µm definiert ist. Der inhalierbare Anteil kann mittels eines "Andersen Impactors" gemessen werden. Für eine gute Proteinabsorption ist es wichtig, nicht nur eine Verneblung ohne wesentlichen Aktivitätsverlust zu erreichen, sondern ein Aerosol mit einem guten (ca. 60%) inhalierbaren Anteil zu generieren. Aerosole mit einem MMAD von weniger als 5.8 µm sind deutlich besser geeignet die Alveoli zu erreichen, wo ihre Chancen absorbiert zu werden deutlich größer sind. Die Effektivität eines Verneblungsgerätes kann auch in einem in vivo System getestet werden, wobei in diesem Fall Faktoren wie Susceptibilität gegenüber Lungenproteasen im Spiel sind. Als Beispiel eines in vivo Testsystems kann einem Hund ein Protein-enthaltender Nebel über einen Tracheal Tubus verabreicht werden. Blutproben werden in passenden Zeitabständen genommen und danach wird der Proteinspiegel im Plasma mit immunologischen oder biologischen Methoden gemessen.

Geeignete Vernebler sind in der bereits oben genannten US-Patentschrift 5,497,944 und der WO97/12687 insbesondere wie in den Figuren 6 a/b (jetzt 4 a/b) beschrieben. Eine bevorzugte Düsenanordnung für die Verneblung der erfindungsgemäßen wäßrigen Aerosolzubereitungen biologisch aktiver Makromoleküle ist in Figur 8 der US-Patentschrift dargestellt.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß der oben beschriebene treibgasfreie Vernebler, der eine vorherbestimmte Menge – beispielsweise 15 Mikroliter - einer Aerosolzubereitung unter hohem Druck zwischen 100 und 500 bar durch mindestens eine Düse mit einem hydraulischen Durchmesser von 1 bis 12 Mikrometer versprüht, so daß inhalierbare Tröpfchen mit einer mittleren Teilchengröße kleiner als 10 Mikrometer entstehen, für die Verneblung flüssiger Aerosolzubereitungen von Proteinen und anderen Makromolekülen gut geeignet ist, weil er eine breite Palette von Proteinen

ohne nennenswerte Aktivitätsverluste vernebeln kann. Bevorzug ist dabei eine Düsenanordnung wie sie in der Figur 8 der oben genannten US-Patentschrift angegeben ist.
Besonders überraschend ist die Fähigkeit von Verneblern dieser Bauart, Interferone zu vernebeln, welche sonst nur mit beträchtlichem Aktivitätsverlust vernebelt werden können. Weiter überraschend ist die besonders hohe Aktivität von Interferon Omega nach Verneblung mit diesem Gerät, nicht nur in *in vitro* sondern auch in *in vivo* Versuchen.

Eine weiterer Vorteil des beanspruchten Verfahrens ist seine überraschende Eigenschaft, auch hochkonzentrierte Lösungen von biologisch aktiven Makromolekülen ohne wesentlichen Aktivitätsverlust vernebeln zu können. Der Gebrauch hochkonzentrierter Lösungen ermöglicht die Verwendung eines Gerätes, das klein genug ist, um bequem in einer Jackentasche oder Handtasche ständig getragen zu werden. Der in Figur 4 offenbarte Vernebler erfüllt diese Voraussetzungen und ermöglicht die Verneblung hochkonzentrierter Lösungen biologisch aktiver Moleküle.

Beispielsweise sind solche Geräte besonders geeignet, um Diabetikern die inhalative Selbstbehandlung mit Insulin zu ermöglichen. Bevorzugt werden hochkonzentrierte wässerige Lösungen mit einer Konzentration von 20 bis 90 mg/ml Insulin eingesetzt, bevorzugt sind Lösungen mit 30 bis 60 mg/ml Insulin und besonders bevorzugt sind Insulinlösungen mit 33 bis 40 mg/ml Insulin. Je nach Größe des zur Verfügung steheden Reservoirs des Verneblers sind Lösungen, die Insulin in einer Konzentration von mehr als 25 mg/ml , bevorzugt mehr als 30mg/ml enthalten, geeignet, um eine therapeutisch wirksame Menge Insulin mit einem Handgerät, wie es das oben beschriebene Device darstellt, inhalieren zu können. Die inhalative Applikation von Insulin ermöglicht einen schnellen Wirkungseintritt der Wirksubstanz, so daß der Patient beispielsweise kurz vor den Mahlzeiten die für ihn erforderliche Menge sich selbst applizieren kann. Die geringe Größe

des Respimats® beispielsweise ermöglicht es dem Patienten das Gerät jederzeit mit sich zu führen.

Der Respimat® (Figur 6 der WO 97/12687) verfügt über eine Dosierkammer mit konstantem Volumen, die es dem Patienten ermöglicht, die für ihn erforderliche Dosis an Insulin durch die Anzahl der Hübe (puffs) zu bestimmen und zu inhalieren. Neben der Anzahl der Hübe ist die Dosierung des Insulins durch die Konzentration der Insulinlösung in dem Vorratsgefäß (72) bestimmt. Sie kann beispielsweise zwischen 25 und 90 mg/ml betragen, bevorzugt sind höher konzentrierte Lösungen ab ca. 30 mg/ml und mehr.

Verfahren zur Herstellung hochkonzentrierter stabiler Insulinlösungen sind beipielsweise in den WO-Anmeldungen 83/00288 (PCT/DK82/00068) und 83/03054 (PCT/DK 83/00024) beschrieben auf die hiermit inhaltlich Bezug genommen wird.

Erfindungsgemäße Aerosolzubereitungen die Insulin enthalten, die mit dem oben beschriebenen Device appliziert werden, sollten eine dynamische Vikosität von über $1600 \cdot 10^{-6}$ Pa s nicht überschreiten, damit der inhalierbare Anteil des erzeugten Sprays nicht unter einen akzeptablen Wert sinkt. Bevorzugt sind Insulinlösungen, die eine Grenzvikosität bis zu $1200 \cdot 10^{-6}$, besonders bevorzugt bis zu $1100 \cdot 10^{-6}$ Pa s (Pascal Sekunde) aufweisen. Falls erforderlich sind anstelle von Wasser als Lösemittel Lösungsmittelgemische verwendbar, um die Viskosität der Arzneimittellösung herabzusetzen. Dies kann beispielsweise durch den Zusatz von Ethanol erfolgen. Der Anteil an Ethanol an der wäßrigen Formulierung kann beispielsweise bis zu 50% betragen, bevorzug ist ein Anteil von 30 %.

Vorzugsweise weist die Aerosolzubereitung eine Viskosität von bis zu $1600 \cdot 10^{-6}$ Pa·s auf, wobei ein Bereich von 900 bis $1100 \cdot 10^{-6}$ Pa·s besonders bevorzugt ist.

Bevorzugt sind ferner Aerosolzubereitungen, deren wäßrige Lösungen eine Viskosität zwischen 900 und $1600 \cdot 10^{-6}$ Pa·s aufweisen, worunter wässrige Lösungen mit einer Viskosität in einem Bereich von 950 und $1300 \cdot 10^{-6}$ Pa·s besonders bevorzugt sind.

Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung eine geeignete Aerosolzubereitung vorzuschlagen, die zur Verwendung in den beanspruchten Verfahren geeignet ist.

Gegenstand der Erfindung sind ferner Aerosolzubereitungen in Form von wäßrigen Lösungen, die als Wirkstoff biologisch aktive Makromoleküle, insbesondere ein Protein oder ein Peptid, in einer Menge zwischen 3 mg/ml und 100 mg/ml, bevorzugt zwischen 25 und 100 mg/ml.

Überraschenderweise hat sich gezeigt, daß nach dem erfindungsgemäß beanspruchten Verfahren auch höher viskose Lösungen von Makromolekülen zu inhalierbaren Tröpfchen geeigneter Tröpfchengröße versprüht werden können. Dies ermöglicht die Applikation größerer Wirkstoffmengen pro Anwendung und erhöht damit die therapeutische Wirksamkeit von Makromolekülen bei der inhalativen Therapie.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren können Makromoleküle (zum Beispiel Albumin) enthaltende wäßrige Aerosolzubereitungen bis zu einer Viskosität von $1600 \cdot 10^{-6}$ Pa s (gemessen bei 25°C) eingesetzt werden. Bei einer Viskosität von $1500 \cdot 10^{-6}$ Pa s wurde noch ein inhalierbarer Anteil von 32 % ermittelt.

Bevorzugt sind höhere Viskose Lösungen von Makromolekülen, die eine Viskosität bis zu $1100 \cdot 10^{-6}$ Pa s aufweisen. Bei solchen Lösungen wird ein inhalierbarer Anteil an wirkstoffhaltigen Tröpfchen von ca. 60 % errreicht. Die

angegebenen Grenzviskositäten wurden mit einem Ostwald Viskosimeter nach literaturbekannter Methode bestimmt. Zum Vergleich, die Viskosität von Wasser liegt bei $894 \cdot 10^{-6}$ Pa s (gemessen bei 25°C).

Um Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens zu illustrieren, werden im folgenden *in vitro* und *in vivo* Versuche mit einer Interferon Omega Lösung beschrieben.

In vitro Versuche mit Respimat® und Interferon Omega

Das Reservoir eines Respimat Gerätes (a) wurde mit einer 5mg/ml Interferon Omega Lösung (in 50 mM Trinatriumcitrat, 150 mM NaCl, pH 5.5 formuliert) gefüllt. Das Gerät wurde aktiviert, und ein Volumen von ca. 12.9 µl (ein Hub) in einem Luftstrom von 28 l/Min vernebelt. Die vernebelte Lösung wurde in einer Falle (Fig. 1) gefangen. Interferon Omega wurde in der Reservoirlösung und in der gefangenen Falle Lösung, immunologisch, mittels eines ELISAs, und biologisch, durch die Hemmung der Zerstörung von Encephalo-Myocarditis Virus infizierten A549 Zellen, bestimmt. Die immunologische Bestimmung von Interferon ist relativ einfach. Veröffentlichte Untersuchungen mit vernebelten Proteinen sind in mehreren Fällen auf immunologische Messungen beschränkt. Zusätzliche biologische Messungen sind jedoch sehr wichtig, weil sie eine besonders empfindliche und therapeutisch relevante Methode der Quantifizierung der Proteinzerstörung sind. Sie geben nicht immer das gleiche Ergebnis wie physiko-chemische oder immunologische Methoden, weil ein Molekül biologische Fähigkeiten verlieren kann, ohne daß sich seine Bindung an Antikörper verändert.

In drei Versuchen wurde, bezogen auf die Ausgangslösung, 84%, 77% und 98% des immunologisch identifizierbaren Interferons in der Falle Lösung (b) wiedergefunden. Biologische Messungen mit den gleichen Lösungen ergaben 54%, 47% und 81% Wiederfindung des biologisch identifizierbaren Interferons in der Falle Lösung. Dieser sehr hohe Anteil zeigt, daß die

Verneblung mittels des Respimat Gerätes nur einen relativ kleinen Teil der Aktivität des Interferons zerstört. Der Nebel von einem Respimat Gerät, wie oben beschrieben, wurde auch in einen Andersen Impactor mittels eines Luftstroms (28 l/Min) geleitet. Der Anteil von Teilchen mit einer Größe von weniger als 5.8 µm ('inhalierbarer Anteil') wurde gemessen. Der inhalierbare Anteil entsprach 70% (immunologische Messungen). Proteine wie Interferone sind oft mit Human Serum Albumin formuliert, um einen weiteren Schutz für die empfindlichen Interferone zu bieten. Eine Formulierung wie oben, aber mit zusätzlichem Human Serum Albumin (0.5%) wurde auch getestet. In drei Versuchen wurde ebenso bezogen auf die Ausgangslösung, 83%, 83% und 79% des immunologisch identifizierbaren Interferons in der Falle Lösung (b) wiedergewonnen. Biologische Messungen mit den gleichen Lösungen ergaben 60%, 54% und 66% des biologisch aktiven Interferons in der Falle Lösung. Der inhalierbare Anteil (immunologische Messungen) war 67%.
In einem weiteren Ansatz wurde eine konzentrierte Interferon Omega Lösung mit einer Konzentration von 53 mg/ml in das Reservoir des Respimat Gerätes gefüllt und anschließend vernebelt. In vier Versuchen wurde, bezogen auf die Ausgangslösung, 100%, 60%, 68% und 72% des immunologisch identifizierbaren Interferons in der Falle Lösung (b) wiedergefunden. Biologische Messungen mit den gleichen Lösungen ergaben 95%, 98%, 61% und 83% Wiederfindung des biologisch identifizierbaren Interferons in der Falle Lösung. Diese hohe Wiederfindung zeigt, daß mittels des Respimat Gerätes auch konzentrierte Proteinlösungen vernebelt werden können, ohne daß es dabei zu übermäßigen Verlusten der Interferonaktivität kommt.

In vivo Versuche mit Respimat® und Interferon Omega

Interferon Omega wurde inhalativ und intravenös in getrennten Versuchen am gleichen Hund appliziert. Es wurden die Blutspiegel des Interferons zu verschiedenen Zeitpunkten immunologisch und biologisch gemessen. Weiters wurde der Neopterinspiegel im Blut gemessen. Neopterin ist ein Marker für Immunaktivierung; es wird von Macrophagen nach Interferon-Reiz

freigesetzt [siehe Fuchs et al 'Neopterin, biochemistry and clinical use as a marker for cellular immune reactions' Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 101: 1-6 (1993)]. Die Messung des Neopterinspiegels dient zur Quantifizierung der Interferonwirksamkeit.

Die Applikation des Interferons beim Hund erfolgte unter Pentobarbitalnarkose nach vorheriger Basissedation. Das Tier wurde intubiert und künstlich beatmet (Volumen-kontrollierte Beatmung: Minutenvolumen 4l/Min, Frequenz 10 Hübe/Min.). Insgesamt 20 Hübe wurden vom Respimat Gerät geliefert. Jeder Hub wurde zu Beginn einer Inspiration appliziert. Nach der Inspirationsphase gab es 5 Sekunden Pause vor der Expiration. Vor der nächsten Interferon Omega Applikation wurden dem Tier zwei Atemzyklen ohne Beeinflussung erlaubt. Blut für Serum und Heparin-Plasma wurde vor Interferon Applikation und zu verschiedenen Zeitpunkten bis 14 Tage nach der Interferon Applikation entnommen. Interferon Omega wurde in Heparin-Plasma immunologisch mittels eines ELISAs, und biologisch durch die Hemmung der Zerstörung von Encephalo-Myocarditis Virus infizierten A549 Zellen, bestimmt. Serum-Neopterin wurde immunologisch bestimmt. Figur 2 zeigt die immunologisch (Fig. 2a) und biologisch (Fig. 2b) gemessenen Interferon Omega Spiegel nach 20 Hüben Interferon Omega vom Respimat Gerät. Überraschenderweise wurde nach inhalativer Gabe ein sehr hoher Serum Neopterin Spiegel gemessen. Im *in vitro* Versuch entsprach das ausgebrachte Maß von Lösung nach einem Hub des Respimat Gerätes durchschnittlich 12,8 mg/Hub. Deshalb ist zu erwarten, daß bei einer 5 mg/ml Lösung mit 20 Hüben des Respimates ca. 1,28 mg Interferon geliefert werden. Neopterin Messungen nach Gabe dieser Menge ergaben deutlich höhere und länger andauernde Spiegel, als Neopterin Messungen nach der Gabe von 0,32 mg Interferon i.v. Fig. 3 illustriert dieses Ergebnis. Die hohen Neopterin Spiegel dienen als Beweis, daß die Applikation von Interferon durch den Respimat zu einer guten biologischen Wirksamkeit führen kann.

Die Vorteile des Respimat Gerätes für die Verneblung von biologischen aktiven Makromolekülen ist nicht nur auf Interferone begrenzt, wie ein zweites Beispiel zeigt.

In vitro Versuche mit Respimat® und Mangan Superoxid Dismutase

Das Gerät für die Veneblung der Test Substanz und die dazugehörige Falle war wie in Fig. 1 dargestellt. In diesem Versuch wurde das Reservoir (a) des Respimat Gerätes mit 3.3 mg/ml Mangan Superoxid Dismutase (MnSOD) in phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) gefüllt. Das Gerät wurde aktiviert, und ein Volumen von ca. 13 µl (ein Hub) in einem Luftstrom von 28 l/Min vernebelt. Die genaue vernebelte Menge wurde gravimetrisch bestimmt (Messungen in drei aufeinander folgenden Versuchen: 12,8, 13,7 und 14,3 mg). Die vernebelte Lösung wurde in einer Falle (b) gefangen. Inhalt dieser Falle war 20 ml PBS. Zusätzlich wurden 2 ml 5% Rinder Serum Albumin zugegeben, um Proteine in der Falle zu stabilisieren. MnSOD wurde in der Reservoirlösung und in der gefangenen Falle Lösung, immunologisch mittels eines ELISAs, und enzymatisch durch die Reduktion der Superoxidmenge nach einer Xanthin/Xanthin-Oxidase Reaktion bestimmt . In drei Versuchen wurde 78%, 89% und 83% der immunologisch identifizierbaren MnSOD der vernebelten Lösung in der Falle Lösung (b) gemessen. Es gab keinen messbaren Verlust der enzymatischen Aktivität nach Verneblung. Der inhalierbare Anteil (immunologische Messungen) war 61%.

Im nachfolgenden Beispiel wird die Herstellung einer erfindungsgemäßen Aerosolzubereitung beschrieben die Insulin als Wirkstoff enthält.

Vorbereitung der Insulinlösung und Befüllung des Verneblers.

175 mg kristallisiertes Insulin (Natriumsalz) vom Rind (enstprechend 4462.6 I.E. nach Angabe des Herstellers) wurden in 3.5 ml sterilem gereinigtem

Wasser (Seralpur®-Wasser) gelöst. Anschließend wurde unter leichtem Rühren 8.5 µl m-Cresol (entsprechend 8,65 mg) und 7,53 mg Phenol, gelöst in 100 µl sterilem, greinigtem Wasser, hinzugefügt. Zu dieser Lösung wurden 365 µl einer 5 mg/ml $ZnCl_2$-Lösung gegeben (entsprechend einem Gewichtsanteil von 0.5% Zink bezogen auf die eingesetzte Insulinmenge) und der pH Wert auf 7.4 mit 0.2 N NaOH eingestellt. Das Volumen des Gemisches wurde auf 5 ml mit sterilem, gereinigtem Wasser aufgefüllt und durch einen sterilen Milliporefilter (Porengröße 0.22 µm) filtriert. 4,5 ml der Aerosolzubereitung wurden in den Vorratsbehälter (72 Figur 4) des Verneblers (Respimat) überführt. Der Behälter wurde mit einer Kappe verschlossen und das Device mit dem Behälter bestückt.

Die so hergestellte Aerosolzubereitung weist eine Konzentration von ca. 35mg/ml Insulin auf, wobei die Viskosität dieser Lösung ca. $1020 \cdot 10^{-6}$ Pa · s beträgt.

In vivo Versuch mit dem Respimat® und hoch-konzentrierter Insulinlösung

Die Applikation des Insulins beim Hund erfolgte unter Pentobarbitalnarkose nach vorheriger Basissedation. Das Tier wurde intubiert und künstlich beatmet wie vorher. Insgesamt wurden 6 Hübe Insulinlösung vom Respimat Gerät geliefert. Jeder Hub wurde zu Beginn einer Inspiration appliziert. Zwischen der Inspirationsphase und der Expiration war eine Pause von 5 Sekunden. Vor der nächsten Insulinapplikation wurden dem Tier zwei Atemzyklen ohne Beeinflüßung erlaubt. Blut wurde 1 Std. vor der Applikation, gleichzeitig mit der Applikation und zu verschiedenen Zeitpunkten danach über 8 Stunden entnommen. Der Blutglucosespiegel wurde im frischen Blut nach der Methode von Trasch, Koller und Tritschler (Klein. Chem. 30; 969 [1984]) mit Hilfe eines Refletron®-gerätes (Boehringer Mannheim) gemessen. Überraschenderweise wurde auch mit dieser hochkonzentrierten Insulinlösung eine gute biologischen Wirksamkeit (Senkung des

Blutglucosespiegels nach inhalative Insulingabe) gefunden. Fig. 5 illustriert dieses Ergebnis.

Die erfindungsgemäßen wäßrigen Aerosolzubereitungen können falls erforderlich neben dem Wirkstoff und Wasser weitere Lösemittel – wie z.B. Ethanol – enthalten. Die Menge an Ethanol wird in Abhängigkeit von den Löseeigenschaften der Wirkstoffe dadurch begrenzt, daß bei zu hohen Konzentrationen der Wirkstoff aus der Aerosolzubereitung ausfallen kann. Zusätze zur Stabilisierung der Lösung wie beispielsweise pharmakologisch unbedenkliche Konservierungsmittel wie z.B. Ethanol, Phenol, Kresol oder Paraben, pharmakologisch verträgliche Säuren, Basen oder Puffer zur Einstellung des pH-Wertes oder Surfactants sind möglich. Des weiteren ist zur Stabilisierung der Lösung oder zur Verbesserung der Aerosolqualität der Zusatz eines Metall-Chelatbildners – wie z. B. EDTA – möglich. Zur Verbesserung der Löslichkeit und / oder der Stabilität des Wirkstoffes in der Aerosolzubereitung können Aminosäuren, wie Aspartsäure, Glutamsäure (Asparagin, Glutamin) und insbesondere Prolin zugesetzt werden.

Zusätzlich zu Interferonen, Superoxid Disumtase und Insulin verkörpern folgende Wirkstoffe bevorzugte Wirkstoffe der erfindungsgemäßen Arzneimittelzubereitung:

Antisense Oligonukleotide
Orexine
Erythropoetin
Tumor Nekrose Faktor-alpha
Tumor Nekrose Faktor-beta
G-CSF („Granulocyte colony stimulating factor")
GM-CSF („Granulocyte-macrophage colony stimulating factor")
Annexine
Calcitonin

Leptine

Parathormone

Parathormone Fragment

Interleukine wie z.B.,Interleukin 2, Interleukin10, Interleukin 12

Lösliches ICAM („Intercellular adhesion molecule")

Somatostatin

Somatotropin

tPA („Tissue plasminogen activator")

TNK-tPA

Tumorassozierte Antigene (als Peptid, Protein oder als DNA)

Peptid Bradykinin Antagonisten

Urodilatin

GHRH (Growth hormone releasing hormone)

CRF (Corticotropin releasing factor)

EMAP II

Heparin

Lösliche Interleukin Rezeptoren wie sIL-1 Rezeptor

Impfstoffe wie Hepatitis Vakzine oder Masern Vakzine

Antisense Polynukleotide

Transkriptions Faktoren

Patentansprüche

1) Wäßrige Aerosolzubereitung für die inhalative Applikation von biologisch aktiven Makromolekülen als Wirkstoff, dadurch gekennzeichnet, daß die wäßrige Aerosolzubereitung den Wirkstoff in einer Konzentration zwischen 3 mg/ml und 150 mg/ml, bevorzugt zwischen 25 und 100 mg/ml enthält.

2) Wäßrige Aerosolzubereitung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein biologisch aktives Protein ist.

3) Wäßrige Aerosolzubereitung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirkstoff Insulin verwendet wird.

4) Wäßrige Aerosolzubereitung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirkstoff Insulin in einer Konzentration größer 25 mg/ml, bevorzugt größer 30mg/ml verwendet wird.

5) Wäßrige Aerosolzubereitung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirkstoff Verbindungen ausgewählt aus der folgenden Gruppe verwendet werden:

Antisense Oligonukleotide
Orexine
Erythropoetin
Tumor Nekrose Faktor-alpha
Tumor Nekrose Faktor-beta
G-CSF („Granulocyte colony stimulating factor")
GM-CSF („Granulocyte-macrophage colony stimulating factor")
Annexine

Calcitonin
Leptine
Parathormone
Parathormone Fragment
Interleukine wie z.B.,Interleukin 2, Interleukin10, Interleukin 12
Lösliches ICAM („Intercellular adhesion molecule")
Somatostatin
Somatotropin
tPA („Tissue plasminogen activator")
TNK-tPA
Tumorassozierte Antigene (als Peptid, Protein oder als DNA)
Peptid Bradykinin Antagonisten
Urodilatin
GHRH (Growth hormone releasing hormone)
CRF (Corticotropin releasing factor)
EMAP II
Heparin
Lösliche Interleukin Rezeptoren wie sIL-1 Rezeptor
Impfstoffe wie Hepatitis Vakzine oder Masern Vakzine
Antisense Polynukleotide
Transkriptions Faktoren.

6) Wäßrige Aerosolzubereitung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirkstoff eine Superoxid Dismutase verwendet wird.

7) Wäßrige Aerosolzubereitung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirkstoff ein Interferon verwendet wird.

8) Wäßrige Aerosolzubereitung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirkstoff ein Interferon Omega verwendet wird.

9) Wäßrige Aerosolzubereitung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen oder mehrere Hilfsstoffe aus der Gruppe der oberflächenaktiven Stoffe, wie Surfactants, Emulgatoren, Stabilisatoren, Permeationsverbesserer und/oder Konservierungsstoffe enthält.

10) Wäßrige Aerosolzubereitung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Aminosäure enthält.

11) Wäßrige Aerosolzubereitung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß sie Prolin, Aspartsäure oder Glutamsäure zur Verbesserung der Löslichkeit oder der Stabilität des Wirkstoffes enthält.

12) Wäßrige Aerosolzubereitung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Aerosolzubereitung eine Viskosität von bis zu $1600 \cdot 10^{-6}$ Pa·s aufweist.

13) Wäßrige Aerosolzubereitung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Aerosolzubereitung eine Viskosität zwischen $900 \cdot 10^{-6}$ und $1100 \cdot 10^{-6}$ Pa·s aufweist.

14) Wäßrige Aersolzubereitung für die inhalative Applikation von biologisch aktiven Makromolekülen als Wirkstoff, dadurch gekennzeichnet, daß die wäßrige Lösung eine Viskosität zwischen $900 \cdot 10^{-6}$ und $1600 \cdot 10^{-6}$ Pa·s aufweist.

15) Wäßrige Aersolzubereitung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die wäßrige Lösung eine Viskosität zwischen $950 \cdot 10^{-6}$ und $1300 \cdot 10^{-6}$ Pa·s aufweist.

16) Wäßrige Aersolzubereitung nach Anspruch 13, 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Aerosolzubereitung einen in den Ansprüchen 3 oder 5 genannten Wirkstoff enthält.

17) Verfahren zur Herstellung von Aerosolen für die inhalative Applikation von biologisch aktiven Makromolekülen, insbesondere von Peptiden oder Proteinen als Wirkstoff, aus einer den Wirkstoff enthaltenen Aerosolzubereitung, dadurch gekennzeichnet, daß in einem treibgasfreien Vernebler

eine therapeutisch wirksame Menge einer Einzeldosierung der Aerosolzubereitung in einer Meßkammer abgemessen und unter hohem Druck zwischen 100 und 500 bar durch mindestens eine Düse mit einem hydraulichen Durchmesser von 1 bis 12 Mikrometer

zu inhalierbaren Tröpfchen mit einer mittleren Teilchengröße kleiner als 10 Mikrometer innerhalb einer Zeit zwischen einer und zwei Sekunden versprüht wird.

18) Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die wirksame Menge der Einzeldosierung zwischen 10 und 20 Mikroliter beträgt.

19) Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß der Vernebler zwei Düsen aufweist, die so gerichtet sind, daß sich die

beiden Strahlen so treffen, daß die Aerosolzubereitung vernebelt wird.

20) Verfahren nach Anspruch 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß eine wässrige Aerosolzubereitung gemäß einen der Ansprüche 1 bis 16 eingesetzt wird.

21) Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff in der Aerosolzubereitung Insulin ist.

22) Verfahren zu inhalativen Applikation von Insulin zur Behandlung von Diabetes , dadurch gekennzeichnet, daß zwischen 10 und 50 Mikroliter einer Lösung, die zwischen 25mg/ml und 60mg/ml Insulin enthalten unter Verwendung eines Verneblers in einer einzigen Anwendung zu inhalierfähigen Tröpfchen versprüht werden.

23) Verfahren nach Anspuch 22, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen 10 und 20 Mikroliter einer Lösung,die zwischen 30 und 40 mg/ml Insulin enthält inhaliert werden.

24) Verwendung einer Lösung, die mehr als 30mg/ml Insulin enthält zur Herstellung eines Aerosols mit mittlerer Teilchengröße von unter 10 Mikrometer zur inhalativen behandlung der Diabetes.

25) Verwendung einer Lösung, die zwischen 25 und 60 mg/ml Insulin enthält zur Herstellung eines Aerosols mit einer mittleren Teilchengröße von unter 10 Mikrometer zur inhalativen Behandlung von Diabetes.

26) Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Aerosol aus 10 bis 50 Mikroliter , bevorzugt 10 bis 20 Mikroliter Lösung unter verwendung eines treibgasfreien Verneblers hergestellt wird.

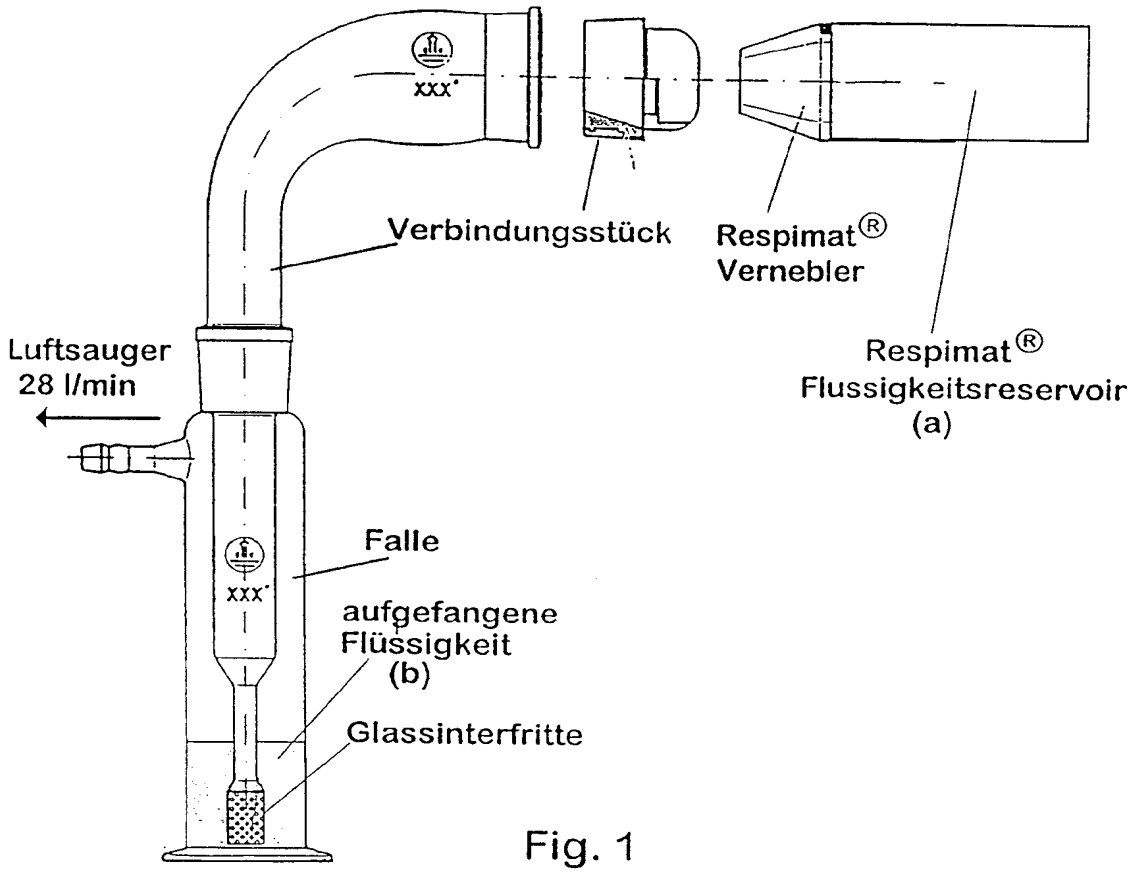

Verbindungsstück
Respimat®
Vernebler
Respimat®
Flussigkeitsreservoir
(a)
Luftsauger
28 l/min
Falle
aufgefangene
Flüssigkeit
(b)
Glassinterfritte

Fig. 1

Fig. 2: INTERFERON OMEGA MESSUNGEN (a) MIT IMMUNOASSAY (ELISA) ODER (b) MIT BIOASSAY (ANTI-VIRALE AKTIVITÄT) HUND NR. 95-1467

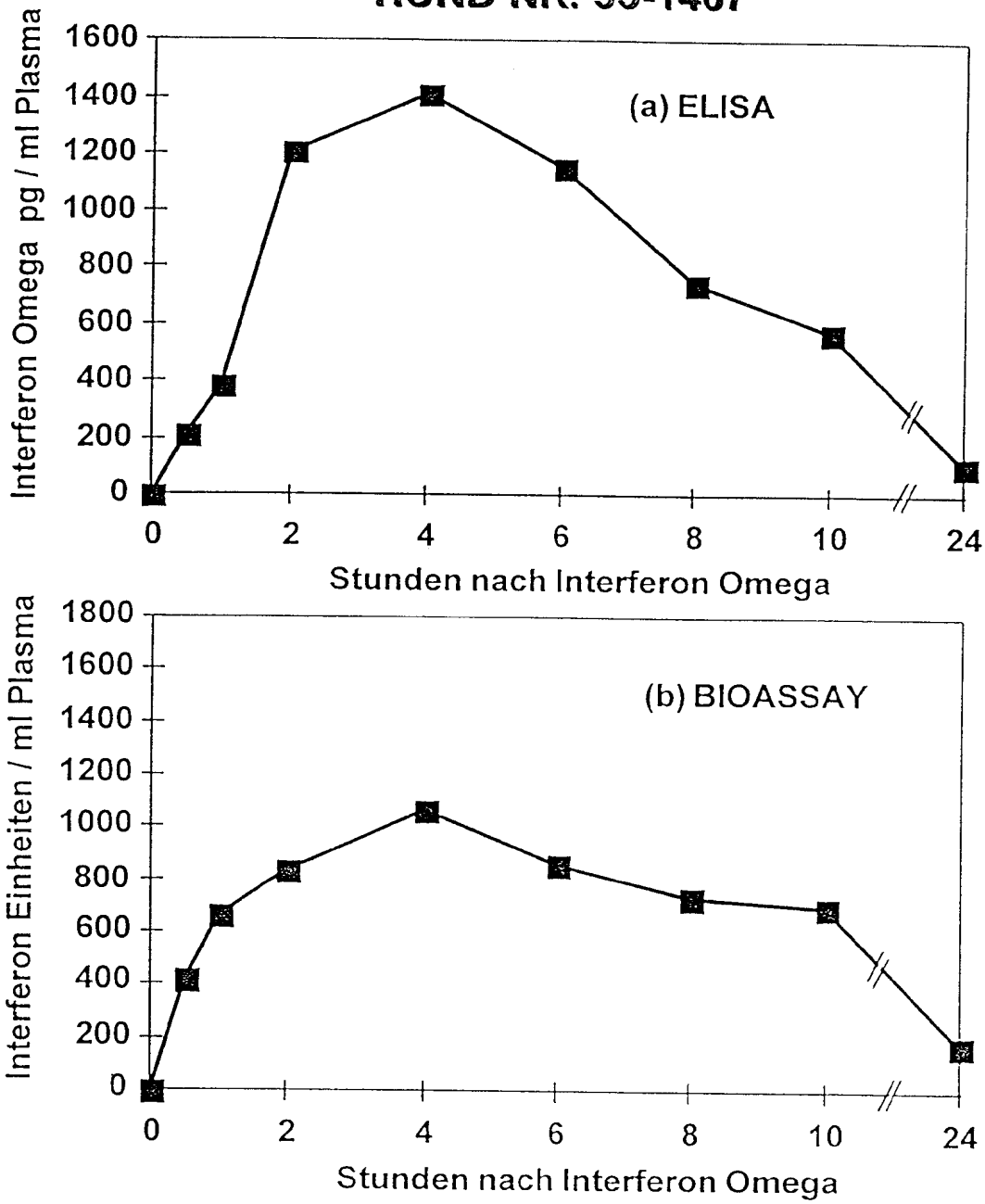
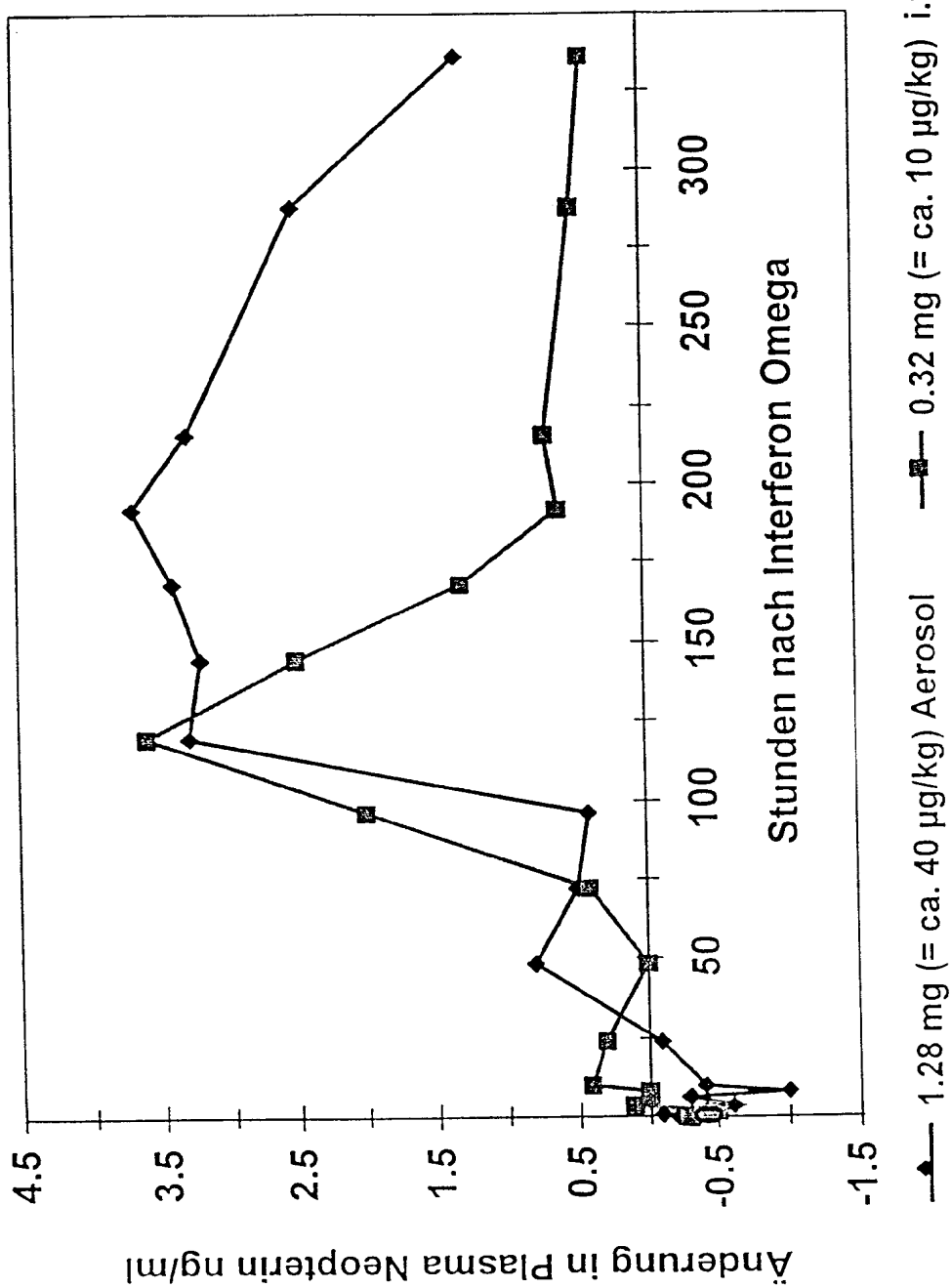


Fig 3.: NEOPTERIN FREISETZUNG IN PLASMA NACH AEROSOL ODER I.V. INTERFERON OMEGA GABE - HUND Nr. 95-1467



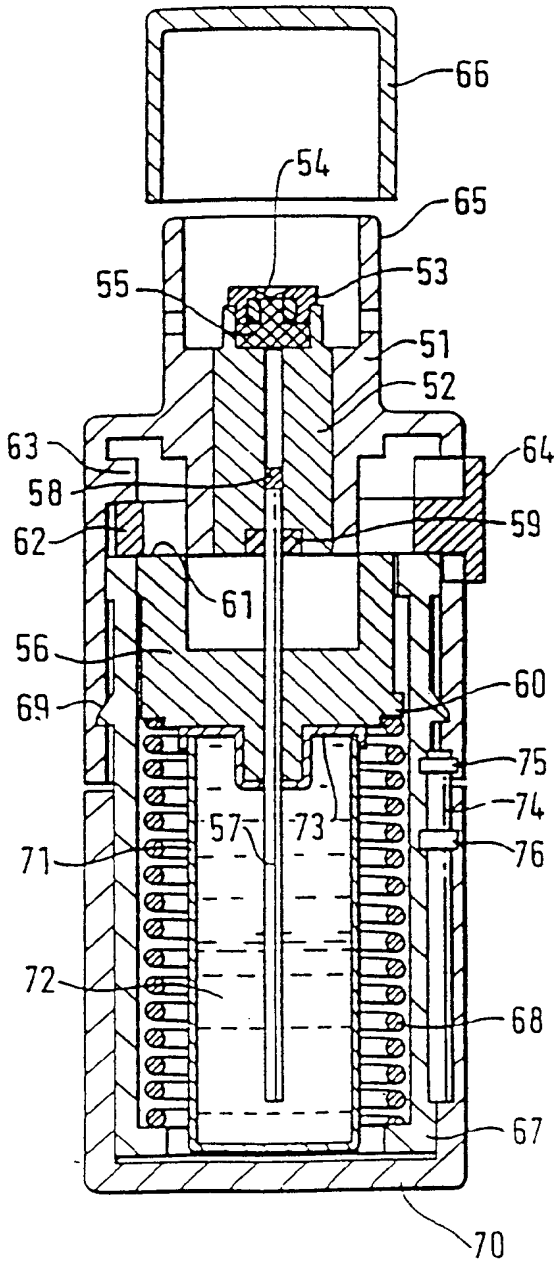

66
54
65
55
53
51
52
63
64
58
59
62
61
56
60
69
75
74
57
73
71
76
72
68
67
70

FIG. 4a

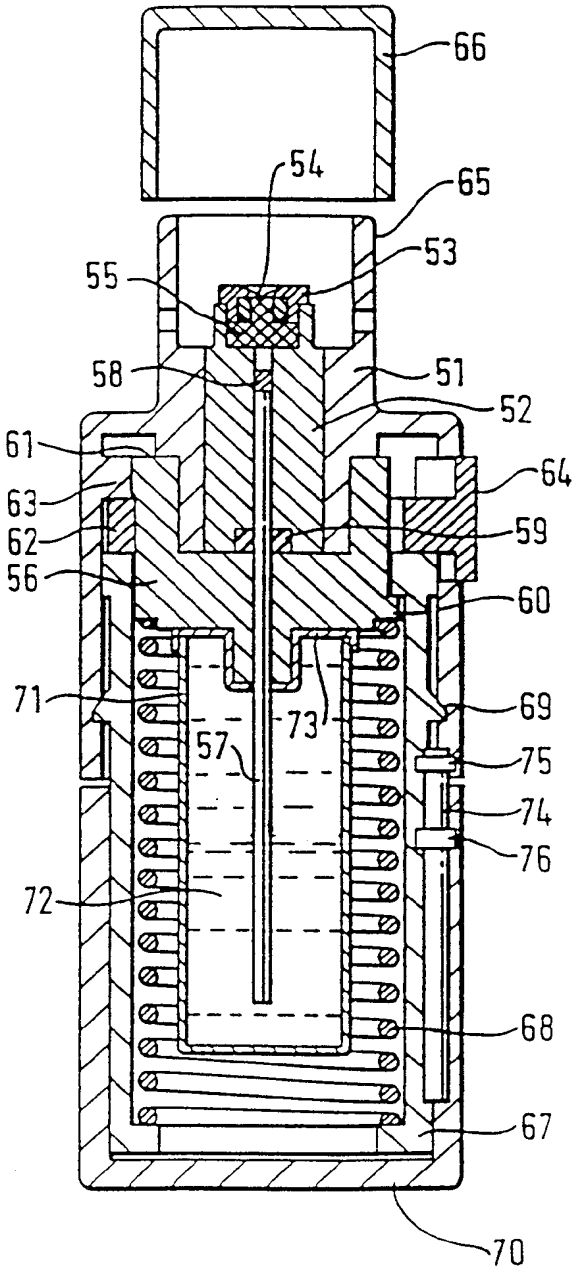
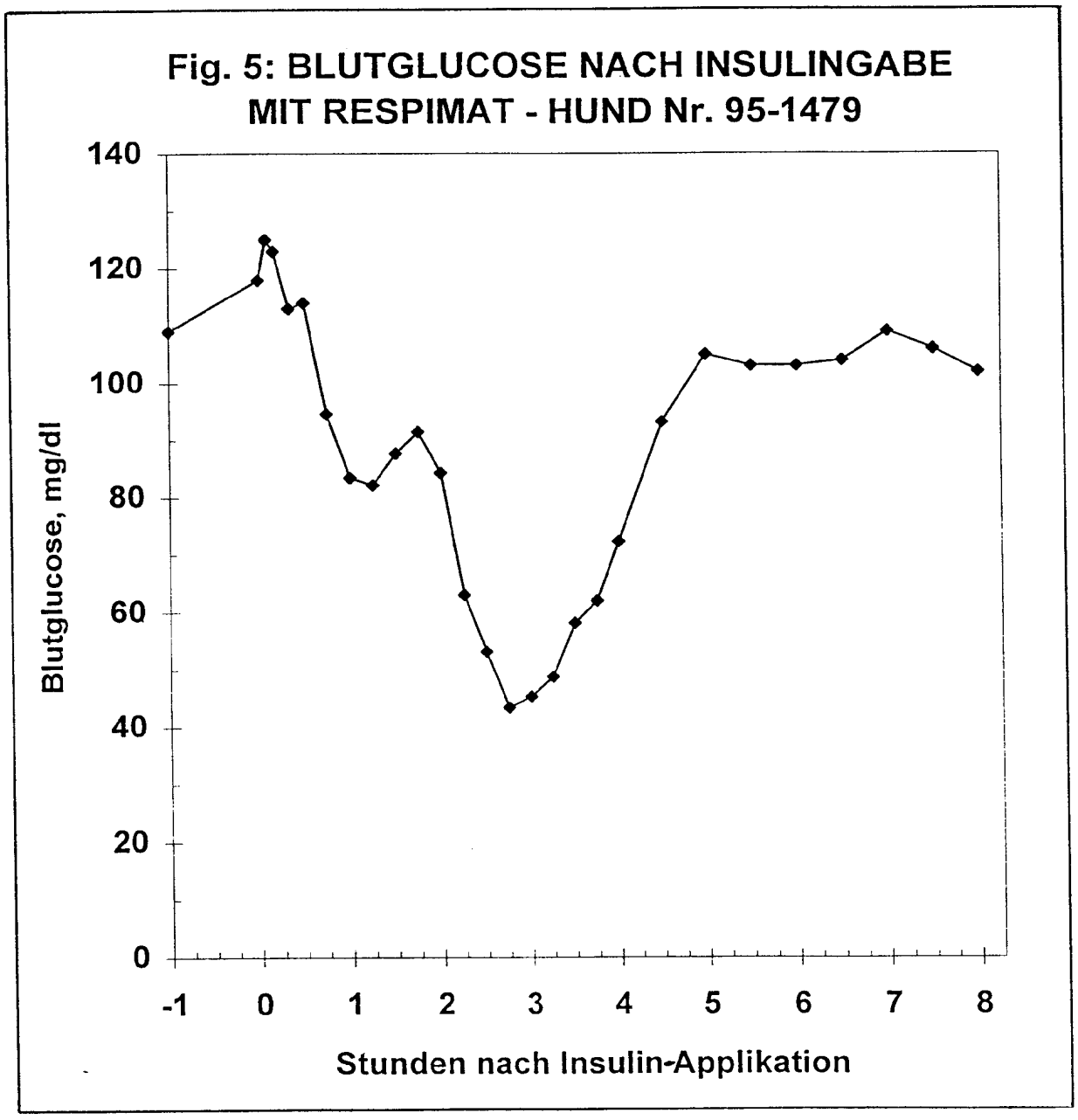

66
54
65
55
53
58
51
52
61
64
63
59
62
56
60
71
69
73
57
75
74
76
72
68
67
70

FIG. 4b


Fig. 5: BLUTGLUCOSE NACH INSULINGABE
MIT RESPIMAT - HUND Nr. 95-1479
Blutglucose, mg/dl
140
120
100
80
60
40
20
0
-1
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Stunden nach Insulin-Applikation

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte onal Application No
PCT/EP 98/04803

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K9/00 A61K38/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 03034 A (AMGEN INC.) 2 February 1995 see claims 10-12,18 see page 2, line 5 - line 17	1,2,5,9, 17-20
X	WO 94 17822 A (T CELL SCIENCES) 18 August 1994 see claims 1,5,16,17 see page 67, line 10 - line 20	1,2,9, 17-20
A	DE 41 17 078 A (BOEHRINGER INGELHEIM) 26 November 1992 see the whole document	1-26

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
7 December 1998	15/12/1998

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Ventura Amat, A

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte ional Application No
PCT/EP 98/04803

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 92 06704 A (AUTOIMMUNE INC.) 30 April 1992 see claims 10,11 see page 17, line 5 - line 11 see page 23; examples 4,5	1-26
A	WO 90 09781 A (RORER INTERNATIONAL) 7 September 1990 see claims 1,3,4,7,12	1-26

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter nal Application No
PCT/EP 98/04803

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9503034 A	02-02-1995	AU 691514 B	21-05-1998
		AU 7473294 A	20-02-1995
		CA 2167538 A	02-02-1995
		EP 0710102 A	08-05-1996
		FI 960253 A	18-03-1996
		JP 9501418 T	10-02-1997
		NO 960217 A	18-03-1996
		NZ 271181 A	26-06-1998
WO 9417822 A	18-08-1994	AU 685433 B	22-01-1998
		AU 6237294 A	29-08-1994
		CA 2155933 A	18-08-1994
		EP 0682526 A	22-11-1995
		JP 8511506 T	03-12-1996
DE 4117078 A	26-11-1992	AU 1755792 A	08-01-1993
		WO 9221332 A	10-12-1992
WO 9206704 A	30-04-1992	AU 659419 B	18-05-1995
		AU 8767991 A	20-05-1992
		CA 2093806 A	11-04-1992
		EP 0552256 A	28-07-1993
		HU 64235 A	28-12-1993
		JP 2548056 B	30-10-1996
		JP 6504986 T	09-06-1994
		US 5763396 A	09-06-1998
		US 5643868 A	01-07-1997
		US 5720955 A	24-02-1998
		US 5783188 A	21-07-1998
WO 9009781 A	07-09-1990	AU 5194990 A	26-09-1990
		CA 2050905 A	24-08-1990
		EP 0460064 A	11-12-1991

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte onales Aktenzeichen
PCT/EP 98/04803

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K9/00 A61K38/28

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 03034 A (AMGEN INC.) 2. Februar 1995 siehe Ansprüche 10-12,18 siehe Seite 2, Zeile 5 - Zeile 17 ---	1,2,5,9, 17-20
X	WO 94 17822 A (T CELL SCIENCES) 18. August 1994 siehe Ansprüche 1,5,16,17 siehe Seite 67, Zeile 10 - Zeile 20 ---	1,2,9, 17-20
A	DE 41 17 078 A (BOEHRINGER INGELHEIM) 26. November 1992 siehe das ganze Dokument ---	1-26
	-/--	

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
7. Dezember 1998	15/12/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Ventura Amat, A

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/04803

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 92 06704 A (AUTOIMMUNE INC.) 30. April 1992 siehe Ansprüche 10,11 siehe Seite 17, Zeile 5 - Zeile 11 siehe Seite 23; Beispiele 4,5 ---	1-26
A	WO 90 09781 A (RORER INTERNATIONAL) 7. September 1990 siehe Ansprüche 1,3,4,7,12 -----	1-26

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internales Aktenzeichen
PCT/EP 98/04803

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9503034 A	02-02-1995	AU 691514 B	21-05-1998
		AU 7473294 A	20-02-1995
		CA 2167538 A	02-02-1995
		EP 0710102 A	08-05-1996
		FI 960253 A	18-03-1996
		JP 9501418 T	10-02-1997
		NO 960217 A	18-03-1996
		NZ 271181 A	26-06-1998
WO 9417822 A	18-08-1994	AU 685433 B	22-01-1998
		AU 6237294 A	29-08-1994
		CA 2155933 A	18-08-1994
		EP 0682526 A	22-11-1995
		JP 8511506 T	03-12-1996
DE 4117078 A	26-11-1992	AU 1755792 A	08-01-1993
		WO 9221332 A	10-12-1992
WO 9206704 A	30-04-1992	AU 659419 B	18-05-1995
		AU 8767991 A	20-05-1992
		CA 2093806 A	11-04-1992
		EP 0552256 A	28-07-1993
		HU 64235 A	28-12-1993
		JP 2548056 B	30-10-1996
		JP 6504986 T	09-06-1994
		US 5763396 A	09-06-1998
		US 5643868 A	01-07-1997
		US 5720955 A	24-02-1998
		US 5783188 A	21-07-1998
WO 9009781 A	07-09-1990	AU 5194990 A	26-09-1990
		CA 2050905 A	24-08-1990
		EP 0460064 A	11-12-1991